



Production of physiologically active chitosan oligosaccharides at high concentration by immobilized chitosanase

著者	明 媚
内容記述	Thesis (Ph. D. in Biotechnology)--University of Tsukuba, (A), no. 4030, 2006.3.24 Includes bibliographical references
発行年	2006
URL	http://hdl.handle.net/2241/18219

氏 名（国籍）	^{みん} 明	^{めい} 媚（中 国）
学 位 の 種 類	博 士（生物工学）	
学 位 記 番 号	博 甲 第 4030 号	
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科	
学位論文題目	Production of Physiologically Active Chitosan Oligosaccharides at High Concentration by Immobilized Chitosanase （固定化キトサナーゼによる生理活性キトサンオリゴ糖の高濃度生産）	
主 査	筑波大学教授	工学博士 向 高 祐 邦
副 査	筑波大学教授	工学博士 田 中 秀 夫
副 査	筑波大学教授（連携大学院）	工学博士 中 嶋 光 敏
副 査	筑波大学講師	博士（工学） 市 川 創 作

論 文 の 内 容 の 要 旨

本論文は、未利用バイオマスとして注目されているキトサンの高度利用に向けて、固定化酵素を利用したキトサンオリゴ糖の高濃度生産手法について研究した成果をまとめたものである。

キトサンオリゴ糖のうち、5 糖と 6 糖は、抗菌性、抗腫瘍性等の生理活性を示すことから、その効率的生産方法の確立が望まれているが、この 5 糖と 6 糖は、キトサン加水分解反応の中間生成物であり、効率的に生産するためには反応の進行を適切に制御する必要がある。固定化酵素を利用すれば、酵素と基質の分離が簡便で反応の制御が容易となるが、基質キトサンは溶解度が低いうえ、その溶液は低濃度でも極めて粘度が高く、これまでの固定化酵素反応器では 2% 以上の濃度では反応が困難なため、5, 6 糖も低濃度でしか生産されていない。そこで目的キトサンオリゴ糖の高濃度生産のため、粘性の高い溶液でも反応操作が可能な固定化酵素を用いたバイオリクターを開発すると共に、基質の高濃度化のための反応操作方法を検討した。

5, 6 糖の収率を高めるためには、固定化酵素表面の物質移動を促進する必要があるため、リアクターの攪拌翼は高粘性溶液においても低負荷で回転が容易な円盤型とし、この円盤に酵素を直接固定化し回転させることで、固定化酵素近傍での物質移動促進を図った。円盤は酵素の固定化面積を広くするため多段化し、これに多点結合法により酵素を固定化した。

酵素を多点結合法で固定化するためには担体が水酸基を有する必要があるため、その素材として、はじめにセルロース系繊維である木綿を使用したが高攪拌下でも 5, 6 糖の収率は低く、これは木綿のマイクロ構造からくる繊維内物質移動抵抗の影響と考えられた。そこで次に寒天を素材とする事とし、そのため円盤状の金網を 5 段取り付け付けた平板型インペラーを作製し、これを寒天で被覆して、その表面に酵素を固定化した。また金網円盤の左右 2 箇所には切り目をいれて傾斜させ、円盤を螺旋状にした傾斜型インペラーも作製した。寒天の表面に固定した酵素は極めて安定性が高く、5 回の繰り返し回分反応に用いても、活性の低下は見られなかった。平板型インペラーと傾斜型インペラーでは、オリゴ糖の生産性能に差異は無く、飽和濃度である 20kg/m³ のキトサン溶液を基質として、5 糖と 6 糖を合計濃度 9kg/m³ で生産できた。

目的オリゴ糖をさらに高濃度で生産するため、基質キトサン粉末を逐次的に添加する反応操作方法を考案し、平板型インペラーを用いたリアクターによる生産を検討した。キトサンの溶解を促進するため、キトサン粉末添加直後に反応溶液の pH 調整を適宜行い、さらに、粘度低下を図るため反応温度を 50℃とした。キトサン粉末の添加時期については、反応液の攪拌トルクの変化を指標とした。その結果、50kg/m³までキトサン濃度を高められ、3回の繰り返し回分反応で、毎回5糖と6糖を合計濃度20kg/m³（対原料収率40%）という極めて高い濃度で生産することができた。

本研究により、基質キトサンの高濃度化が初めて可能となり、また新たに開発した固定化酵素リアクターを用いる事で、これまで報告されている最大濃度7kg/m³の約3倍にあたる20kg/m³で5糖と6糖が生産できた。この成果は、今後様々な分野で幅広い利用が見込まれるキトサンオリゴ糖の効率的な生産技術の確立に寄与するものと考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、優れた生理機能を持つキトサンオリゴ糖の5糖および6糖の固定化酵素を利用した生産に関して、新規なリアクターの開発と高濃度生産のための方法を検討したものである。

キトサンオリゴ糖の原料となるキトサンは水に対する溶解度が低く、また低濃度でも粘稠性が高いため、これまで高濃度での生産ができていない。本論文で提案されたリアクターは、高粘性液でも十分混合攪拌が出来、また直接攪拌翼に酵素が固定化されているので、粘稠液でも酵素周辺での物質移動が促進できる斬新なリアクターである。固定化酵素の安定性も確認されている。また基質の高濃度化にあたっては種々の工夫がなされ、結果的にこれまでにない高濃度でのキトサンオリゴ糖生産が達成されている。まだ収率や生産性の面で課題が残されているが、開発されたリアクターや、比較的溶解度の低い高分子物質の高濃度化の手法は、他のオリゴ糖生産はじめ、酵素を利用する物質生産にも広く利用でき、学術的見地からだけでなく、実用的にも重要な知見を与えるものとして高く評価できる。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。